

## 分子集合性生体物質の分子会合・分解性の分光学的解析

長谷川 健（応用分子化学科）

### 1. はじめに

生命工学の要素技術のひとつとして、薄膜の構造解析があげられる。生命現象は溶液中での化学反応や輸送も重要だが、界面での分子認識や物質輸送が鍵を握ることが多い。生命体で界面といえ、細胞やオルガネラの外壁を構成する薄膜が重要で、多くの場合脂質二重層膜を基本とした非共有結合性分子集合系である。

この分子集合系という概念は特に重要である。生体薄膜の流動モザイクモデルは、非共有結合性の分子集合系として実現できている。時間平均的に流動を無視して見たとき、重要なのは分子が一定の配向を示すことである。すなわち、分子はランダムに並んでいるのではなく、ある程度の規則性を持って並んでいる。結晶ほど整然とはしていないが、水素結合や疎水性相互作用などの分子間力によって、分子配向が引き起こされ、薄膜の機能発現に直結している。つまり、薄膜の分子配向を正確にとらえることは、生物工学の重要な一歩といえる。

今年度は、生命工学に欠くことのできないガラス基板上での薄膜構造解析技術の開発を行った。意外なことに、ガラス基板上での単分子薄膜構造解析はこれまで例がなかった。これは、繰返し周期のない単分子膜では X 線解析法が使えず、一方、ガラスは赤外分光法にとって強い吸収と強烈な干渉縞が解析の障害となるからである。これを解決することは、DNA チップなどのガラスベースの分析技術にとってきわめて重要である。

### 2. 赤外分光法による薄膜構造解析

分子配向を解析するのに、赤外分光法は強力な道具である。赤外スペクトルには、官能

基単位でグループ振動が現れ、これは振動の方向（振動遷移モーメント）が赤外線電場の振動方向と一致したときに最大の吸収となって現れ、互いに直交するときはスペクトルに現れない。<sup>1</sup>

この性質を使うと、赤外透明基板に載せた薄膜に赤外線を垂直に入射させたとき（図 1a）、赤外線がもつ電場振動は光の進行方向に常に垂直（つまり膜面に平行）なので、膜中のグループ振動のうち、膜面に平行なものだけがスペクトルに現れることがわかる。この性質を、透過分光法の表面選択律<sup>1</sup>という。

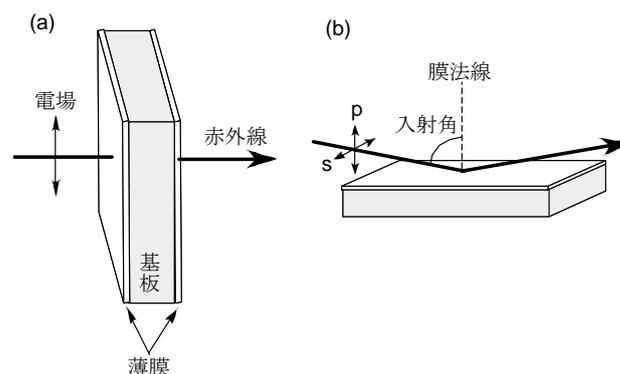


図 1 赤外透過および RA スペクトル測定のご概念図

一方、薄膜を金属面上に作製し、大きな入射角（膜法線方向から測る）で赤外線を入射し、反射スペクトルを測定する方法を、反射吸収 (RA) 法<sup>1</sup>という（図 1b）。RA 法では、反射面に垂直な電場が面近傍に特異的に発生するため、膜中のグループ振動のうち、膜面に垂直なものばかりがスペクトルに現れる。これを赤外 RA 法の表面選択律という。

このように、透過法と RA 法の表面選択律が互いに相補的であることから、二つのスペクトルを得られれば、官能基単位で分子の配向をとらえることができるようになる。例としてステアリン酸カドミウム塩単分子膜を 9

層積んだ膜 (Langmuir-Blodgett (LB) 膜<sup>2,3</sup>) を、実際に赤外透過および RA 法で測定した結果<sup>2</sup>を、図 2 に示す。

これは、基板に対してほぼ垂直に立って配向しているステアリン酸金属塩分子を想定すると理解しやすい。この場合、メチレン基 ( $\text{CH}_2$ ) の対称伸縮振動や逆対称伸縮振動バンド ( $2850$  および  $2917 \text{ cm}^{-1}$ ) は、いずれも膜面にほぼ平行なグループ振動となる。このため、これらのバンドは、透過スペクトルに非常に強く現れている一方で、RA スペクトルには非常に弱く現れている。

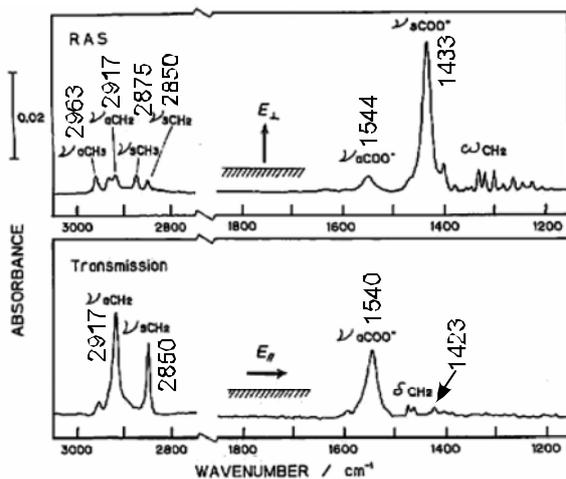


図 2 ステアリン酸カドミウム塩 9 層 LB 膜の赤外透過 (下) および RA (上) スペクトル。基板は各々  $\text{CaF}_2$  および銀蒸着ガラス基板

逆に、 $\text{COO}^-$  対称伸縮振動 ( $\text{ca. } 1430 \text{ cm}^{-1}$ ) は RA スペクトルに非常に強く現れ、透過スペクトルではほとんど見えない。これは、この官能基のグループ振動が膜面に垂直配向していることを示し、実際の分子モデルともよく合う。

このように、透過・RA 法の組み合わせ測定は分子配向を如実に反映した結果を与えるため大変便利だが、異なる二種類の基板 (透明基板および金属基板) の上に '同一の' 薄膜を作製しなくてはならない点が問題である。基板の表面エネルギーは誘電体と金属とは

大きく異なるため、単分子膜が基板の違いに大きな影響を受け、同一の薄膜を比較していることにはならない場合がままあるからである。

### 3. 赤外多角入射分解分光法

これらの分析化学的な問題を解決するため、まったく新しい光学計測の概念を提案した。<sup>3</sup> これは、多角入射分解分光法 (MAIRS) と名づけたもので、図 3 に示すような特殊な概念に基づいている。

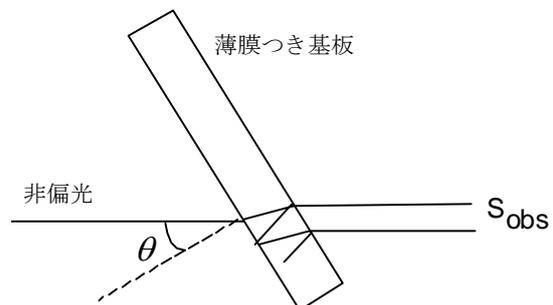


図 3 斜め入射測定と透過光強度の概念図

薄膜に入射した非偏光は、基板や薄膜内部で多重反射を繰り返した後、一部が検出器に届く。このときの光の強度を  $s_{\text{obs}}$  と書くことにする。つまり、 $s_{\text{obs}}$  を  $s_{\text{IP}}$  および  $s_{\text{OP}}$  と理論的に関連付けることが必要である。

これを厳密な従来式の光学理論にのっとり記述するのは非常に難しい。仮想光に関する反射・透過理論が無いことも一因だが、それ以前に、薄膜や基板の光学定数を波長ごとに把握しなければ、厳密な記述はできないからである。つまり、既存の理論的考察では早くも限界が見えてしまうことになる。

この状況を一気に打開するのが計量化学の分野でもっとも基本的な式<sup>1</sup>である、次の形式の式である。

$$\mathbf{A} = \mathbf{CK} + \mathbf{U}_d \quad (1)$$

$\mathbf{A}$  は測定したスペクトルを束ねた行列、 $\mathbf{C}$  は濃度混合比を全サンプルについて記述した行列、 $\mathbf{K}$  は純成分スペクトルをまとめた行列、 $\mathbf{U}_d$  は  $\mathbf{C}$  で説明できなかった  $\mathbf{A}$  の残差をまとめたものである。この式は、Lambert-Beer

則を、行列を使って多成分・多波長系に拡張したものと理解することのできるもので、 $\mathbf{A}$ には通常、複数の吸光度スペクトルが入る。ひとつの吸光度スペクトル  $\mathbf{a}$  は、試料とバックグラウンドのシングルビームスペクトル ( $s_s$  および  $s_b$ ) から次式に従って変換して得られる。

$$\mathbf{a} = -\log_{10}(s_s/s_b) \quad (2)$$

ただし、ベクトル  $s_s$  と  $s_b$  の割り算は、ベクトルの各成分どうしの (各波長での) 割り算という意味である。これを複数のサンプルについてまとめたものが  $\mathbf{A}$  である。

この式は、classical least squares (CLS) 回帰式と呼ばれ、純成分スペクトル  $\mathbf{K}$  が濃度  $\mathbf{C}$  を重みとして線形結合され、吸光度スペクトル  $\mathbf{A}$  をモデル化している点に特徴がある。すなわち、吸光度が濃度に比例するという線形性と、吸光度スペクトルの加算性の両方を示す重要な基礎式である。

測定したスペクトルには、ノイズなどの雑多な情報も混ざっているが、これらは試料濃度  $\mathbf{C}$  とは無関係な量なので、線形結合では説明できない量であるといえる。このため、これらを非線形的な量ということもある。この非線形的な量は、通常、 $\mathbf{U}_d$  項に捨ててしまう。

CLS 回帰式の大きなメリットは、非線形的な量が  $\mathbf{A}$  に含まれていても、 $\mathbf{U}_d$  項に捨ててしまうため、 $\mathbf{C}$  に線形的に応答する情報  $\mathbf{K}$  だけを相手にすることができる、という点である。これは実際には、(3)式のような計算を行うことで、 $\mathbf{A}$  から線形成分を‘引き抜く’という概念で実現する。

$$\mathbf{K} = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{A} \quad (3)$$

ここで、肩つきの T や -1 は、それぞれ転置行列および逆行列を表す。(3)式を計算することで、 $\mathbf{A}$  から  $\mathbf{C}$  に線形応答する成分だけを、 $\mathbf{K}$  として引き抜ける非常に便利な式である。

#### 4. ガラス表面での単分子膜解析

ガラス表面に作製した単分子膜として、最もよく性質のわかっているステアリン酸カドミウムを選んだ。ステアリン酸カドミウム単分子膜は、多くの固体基板上で高度に配向し、結晶化度もきわめて高いことで知られる。

実際に単分子膜を作製し、赤外透過分光法で測定したときのスペクトルを図 4a に示す。

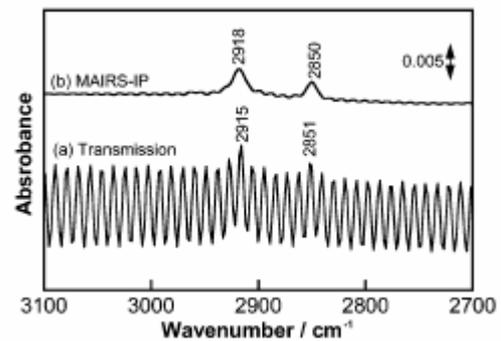


図 4 ステアリン酸カドミウム塩 1 層 LB 膜の赤外透過 (下) および MAIRS (上) スペクトル。基板は 0.3 mm 厚のガラス基板

おびただしい数の干渉縞が現れていることがわかるが、これはガラスによる強い吸収を避けて測定するため、基板を薄くしたことによって現れる光学的な効果で、避けがたいものである。また、実験を行うたびに干渉縞の強度も大きく変わり、再現性の良い光学系を組むことも困難なものである。

それに対し、まったく同一の試料を、われわれが開発した赤外 MAIRS 法で測定した結果を図 4b に示す。赤外 MAIRS 法は、面内に平行 (IP) な振動スペクトルと垂直 (OP) な振動スペクトルを同時に与える方法であるが、今回の実験で重要なのは図 4b に示した IP スペクトルのみである。干渉縞がほとんど取り除かれ、波数位置も明瞭に読み取れるスペクトルが得られている。あとは、このスペクトルのバンド強度の定量的な精度を確かめられれば、MAIRS-IP スペクトルの利用価値が確定する。

そこで、すでに X 線回折法により分子配向

が明らかとなっている累積膜についても測定し、定量的精度を検討した。

用意したのは同じステアリン酸カドミウムの5層LB膜である。この赤外透過スペクトルを図5aに示す。

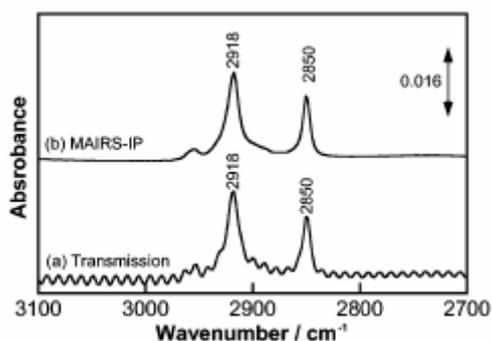


図5 ステアリン酸カドミウム塩5層LB膜の赤外透過(下)およびMAIRS(上)スペクトル。基板は0.3 mm厚のガラス基板

単分子膜に比べてバンド強度が強くなっているため、干渉縞が少々目立たなくなっているが、それでも解析に支障をきたすほど強く現れている。この試料を、赤外MAIRS法で測定した結果を図5bに示す。干渉縞がほぼ完全に取り除かれている。

そこで、光学定数を元にこのバンド強度を理論的に計算してみた。これには、光学異方性を取り入れた透過率計算<sup>5</sup>を行った。委細は省くが、計算の結果、実測のバンド強度をほぼ完璧に再現することに成功した。このことは、MAIRS-IPスペクトルが、単に干渉縞を取り除く効果を持っているだけでなく、得られたスペクトルのバンド強度が極めて精度の高い、定量的に信頼できるものであることを意味している。

そこで、図4bで得られた単分子膜の結果についても同様の計算を行い、実測値との照らし合わせから、ガラス基板上的分子配向を見積もった。その結果、炭化水素鎖軸主鎖が膜法線から約26度傾いていることが始めて明らかとなった。

これは、以前解析した金やゲルマニウム表面での結果(それぞれ8度<sup>5</sup>および18度<sup>6</sup>)に比べて有意に大きく、また表面自由エネルギーの大きさを反映する結果となった。

このように、ガラス基板上で有機超薄膜の構造解析を行う道をはじめて開くことに成功した。

このほか、水素末端処理したシリコン基板表面のキャラクタリゼーションや、プリオン蛋白模擬化合物の凝集状態の解析などの関連する研究<sup>7-11</sup>も行い、生命工学の基礎的な研究を行った。

## 5 参考文献

- 1) 長谷川健「スペクトル定量分析」講談社サイエンティフィク(2005), pp.1-170.
- 2) J. Umemura, "Handbook of Vibrational Spectroscopy" Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R. Eds., Wiley: Chichester, 2002; Vol. 3, p. 982.
- 3) T. Hasegawa *J. Phys. Chem. B* **106**, 4112 (2002).
- 4) T. Hasegawa, Y. Nakano, Y. Ishii *Anal. Chem.* **78**, 1739 (2006).
- 5) T. Hasegawa, S. Takeda, A. Kawaguchi, J. Umemura, *Langmuir* **11**, 1236 (1995).
- 6) T. Hasegawa, J. Nishijo, J. Umemura, W. TheiB *J. Phys. Chem. B*, **105**, 1117 (2001).
- 7) T. Hasegawa, J. Umemura, N. Yamada *J. Mol. Struct.* **735/736**, 63 (2005).
- 8) T. Hasegawa, H. Kakuda, N. Yamada *J. Phys. Chem. B* **109**, 4783 (2005).
- 9) T. Hasegawa, D. Moriya, H. Kakuda, C. Li, J. Orbulescu, R. M. Leblanc *J. Phys. Chem. B* **109**, 12856 (2005).
- 10) H. Kakuda, T. Hasegawa; T. Tanaka, K. Tanaka, M. Shionoya *Chem. Phys. Lett.* **415**, 172 (2005).
- 11) T. Hasegawa *Appl. Spectrosc.* **78**, 1739 (2006).